

BEST AVAILABLE COPY

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 mars 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/19424 A1

(51) Classification internationale des brevets²: A61L 27/36

(74) Mandataire: THIBON LITTAYE, Annick; Cabinet Thibon Littaye, 11, rue de l'Etang, F-78160 Marly-le-Roi (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02464

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international:

7 septembre 2000 (07.09.2000)

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/11809 10 septembre 1999 (10.09.1999) FR

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): OST DEVELOPPEMENT [FR/FR]; 15, rue Georges Besse, F-63100 Clermont-Ferrand (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): FAURIE, Michel [FR/FR]; 10, rue Jean-Moulin, F-63960 Veyre-Monton (FR). ROINE, Corinne [FR/FR]; 3, rue Bargoin, F-63000 Clermont-Ferrand (FR).

(54) Title: METHOD FOR MAKING A MATERIAL FOR BONE PROSTHESIS BY TREATING A NATURAL BONE TISSUE

(54) Titre: PROCEDE DE FABRICATION D'UN MATERIAU DE PROTHESE OSSEUSE PAR TRAITEMENT D'UN TISSU OSSEUX NATUREL

(57) Abstract: The invention concerns a method for making bone grafts, while preserving the bone natural structure, in particular in type I collagen, which consists in submitting natural bone material, in particular that of appropriately cut human femoral heads, to a defatting and purifying treatment comprising at least an acetone-extracting step, advantageously preceded by a step of sensitizing with pressurised water, and advantageously followed by an extraction step using urea, so as to eliminate all contaminating agents, in particular viruses whereof the presence is likely to be present in transmissible form especially in human tissues, such as those of hepatitis, poliomyelitis, aids (HIV), and non-conventional agents such as prions of the Creutzfeld-Jakob disease or related spongiform encephalopathic diseases.

(57) Abrégé: L'invention propose de réaliser des greffons osseux, en préservant la structure naturelle de l'os, notamment en collagène de type I, à soumettre du matériel osseux naturel, notamment celui de têtes de fémurs humains découpées de manière appropriée, à un traitement de délipidation et de purification comportant au moins une étape d'extraction au moyen d'acétone, avantageusement précédée d'une étape de sensibilisation à l'eau sous pression, et avantageusement suivie d'une étape d'extraction au moyen d'urée, de manière à le débarrasser de tous agents contaminans, notamment des virus dont on peut craindre la présence en forme transmissible tout particulièrement dans des tissus d'êtres humains, tels que ceux des hépatites, de la poliomyélite, ou du sida (HIV), et des agents non conventionnels, tels que les prions de la maladie de Creutzfeld-Jacob et des maladies encéphalopathiques spongiformes apparentées.

A1
WO 01/19424

PROCEDE DE FABRICATION D'UN MATERIAU DE PROTHESE OSSEUSE PAR TRAITEMENT D'UN TISSU OSSEUX NATUREL

La présente invention concerne la fabrication d'un matériau biologiquement compatible par traitement d'un tissu osseux d'origine naturelle. Elle a plus précisément pour objet un procédé de fabrication de ce genre de matériaux, 5 mais elle s'étend aux installations comportant des moyens propres à la mise en oeuvre de ce procédé, ainsi qu'aux matériaux obtenus conformément à l'invention et à leurs applications médicales.

Les matériaux du type visé par l'invention sont 10 destinés à être utilisés en tant que matériaux de substitution de l'os, notamment pour constituer des greffons osseux ou des implants quand ils sont sous forme de pièces solides, ou pour être utilisés sous forme d'une composition coulable, notamment pulvérulente, en particulier en 15 stomatologie comme poudre de comblement dentaire ou parodontaire.

Parmi les qualités que l'on demande à ces matériaux, il figure principalement :

- la possibilité de reconstituer, par croissance du 20 tissu osseux sur le matériau, la matière osseuse qui a été détruite, dégradée, ou extraite, c'est-à-dire la capacité du matériau à promouvoir l'ostéosynthèse ;

- l'absence de risque de contamination du receveur par 25 un greffon implanté, et là, on comprendra aisément que la condition soit à appliquer de manière draconienne quand il s'agit d'éviter la transmission de maladies difficiles à soigner ou susceptibles de contrecarrer la prise d'une greffe.

Les deux composantes de ces objectifs sont 30 contradictoires. La recherche d'une ostéosynthèse rapide et durable oriente vers des greffes d'os humain, en autogreffe

ou en allogreffe, malgré les inconvénients des opérations chirurgicales répétées sur un même patient et la rareté des donneurs, alors que les risques de contamination pathologique sont d'autant plus importants que le matériel 5 provient de l'espèce humaine.

En compromis industriel, il existe actuellement sur le marché, des matériaux pour ostéoplastie qui sont produits à partir de tissus osseux naturels de cadavres ou de carcasses de boucherie soumis à des traitements appropriés 10 de purification. Ils évitent d'avoir à procéder à une autogreffe traumatisante pour le patient, ou à une allogreffe avec ses risques de rejet et de contamination pathogène. Les plus intéressants sont ceux qui peuvent être conservés à sec à la température ambiante, alors que 15 d'autres demandent à être lyophilisés ou maintenus à l'état congelé (cryo-conservation). Et malheureusement, ils utilisent trop souvent des traitements agressifs qui les rendent friables et difficiles à utiliser. En outre, les produits ou réactifs classiques que l'on peut utiliser pour 20 éliminer les agents pathogènes ont l'inconvénient d'être destructifs de la constitution osseuse, ce qui est nocif pour les conditions de croissance osseuse sur le greffon par ostéo-conduction et ostéo-induction.

En progrès significatif, la déposante commercialise 25 avec succès un tel matériau, produit par un procédé spécial impliquant une étape consistant à soumettre le tissu osseux d'origine à un traitement d'extraction réalisé au moyen d'un agent sélectif à base d'urée. Ce procédé est décrit notamment dans le brevet français 89 15 363 ou dans le 30 brevet européen EP 0 502 055. Le principal avantage de l'urée réside dans le fait que dans les matériaux obtenus, la structure naturelle de l'os est préservée, avec sa composition essentiellement à base de collagène de type I.

On observera qu'en pratique, les matériaux ainsi 35 commercialisés actuellement, de manière courante, en

matériaux d'ostéosynthèse, sont fabriqués à partir de tissus osseux prélevés sur le squelette d'animaux de boucherie, en particulier à partir d'os bovins. Cette solution est particulièrement commode pour une production industrielle, 5 dans la mesure où l'on peut disposer en grandes quantités d'os provenant des abattoirs.

Il subsiste des circonstances où les chirurgiens ou les dentistes souhaiteraient disposer d'un matériau pour greffe osseuse présentant les mêmes qualités en prise de la 10 greffe, ainsi que les mêmes qualités par rapport à des greffons simplement nettoyés et cryo-conservés (disponibilité à faible coût et commodité d'approvisionnement et de conservation notamment), mais qui soit fabriqué à partir d'os humain et non plus d'os 15 d'animaux de boucherie. On peut effectivement comprendre que les milieux utilisateurs soient dans ce cas plus confiants en l'absence de risques infectieux.

L'un des objectifs de la présente invention est donc de proposer un procédé se prêtant avantageusement à l'emploi 20 d'os humain comme matériel de départ, tant du point de vue technique et qualitatif que du point de vue économique, dans des conditions où l'on ne peut disposer d'os humain aussi facilement que d'os bovin. L'invention vise aussi à mieux satisfaire aux différentes attentes des milieux producteurs 25 et des milieux utilisateurs, sachant que les exigences sanitaires deviennent de plus en plus sévères de jour en jour. Par rapport à l'art antérieur en ce domaine, elle améliore considérablement la sécurité dans la protection contre les risques de contamination divers, en prenant en 30 compte, par exemple, tant ceux liés à des épidémies existantes dans les cheptels, comme les maladies à prions entraînant des dégénérescences spongiformes, assez proches de celles que l'on observe dans le syndrome de Creutzfeld Jacob, que ceux que l'on doit plutôt craindre quand on part 35 d'os humain, et là, il convient, de plus, notamment de s'assurer d'éliminer tout risque touchant au HIV du sida

(virus d'immuno-déficience humaine, ou "human immuno-deficiency virus" en anglais).

Pour ce faire, l'invention propose de réaliser des greffons osseux à partir d'un matériel osseux naturel, par un procédé dont les étapes successives comportent au moins une étape d'extraction sélective des agents pathogènes et délipidante au moyen d'acétone dans des conditions de température n'excédant pas 40 °C.

Plus précisément, suivant les caractéristiques secondaires de l'invention, cette étape d'extraction se fait à température ambiante ordinaire, de telle sorte que la structure osseuse initiale en collagène de type I ne s'en trouve pas dénaturée. On entend par température ambiante ordinaire une température variant en moyenne entre 18 et 25 °C.

Cette étape d'extraction au moyen d'acétone permet une délipidation sélective, d'ordre chimique, des lipides véhiculant des agents pathogènes et des protéines de structure non-collagéniques.

L'acétone peut éventuellement être remplacée par une autre cétone dite inférieure, c'est-à-dire dont la molécule comporte un nombre d'atomes de carbone ne dépassant guère 6.

Préférentiellement, la molécule de cette autre cétone ne possède pas de groupe fonctionnel perturbateur des propriétés de la fonction cétone.

Ainsi, suivant ces deux conditions, la méthyléthylcétone ou l'acétobutyronne possédant respectivement 4 et 5 atomes de carbone dans leur chaîne moléculaire, ne comportant pas d'autres groupements que des groupements alkyle, peuvent par exemple être utilisées à la place de l'acétone.

Cependant, dans le cadre de l'invention, l'acétone a l'avantage d'être plus aisément miscible à l'eau présente

dans la matière (suite à des étapes de traitement préalables) que ses homologues.

Ainsi, suivant l'invention, cette étape d'extraction à l'acétone est avantageusement précédée d'une étape de délipidation classique, dite étape de sensibilisation, par lavage à l'eau sous pression. On entend par étape de délipidation classique une action de dégraissage d'ordre mécanique, ayant pour fonction principale l'extraction des lipides libres, des acides gras et des lipoprotéines associés à la trame osseuse.

L'étape d'extraction à l'acétone est avantageusement combinée à un traitement d'extraction subséquent à l'urée comme précédemment proposé suivant l'art antérieur rappelé ci-dessus (document de brevet européen 0 502 055 en particulier).

Il est à noter que l'acétone présente l'avantage d'être un produit courant, largement disponible à faible coût sur le marché. Ce composé est souvent utilisé pour de simples opérations de dégraissage.

Mais dans ce cas, l'acétone est utilisée en solution aqueuse, fortement diluée, à concentration généralement comprise entre 1 et 10%, et à haute température, généralement à ébullition.

En résultat de l'invention, l'acétone a fait preuve d'une capacité analogue à celle de l'urée de permettre une extraction sélective des protéines non collagéniques pouvant retenir des agents indésirables tout en conservant la structure collagénique essentielle du tissu osseux d'origine. De ce point de vue, la cétone est avantageusement utilisée pure ou quasiment pure, c'est-à-dire non diluée, à une concentration comprise entre 80 et 98 %.

Il est à noter que la cétone est pure, de l'ordre de 98% lorsque l'os y est plongé au début de l'étape

d'extraction, mais en raison de l'étape de sensibilisation préalable, suivant les caractéristiques secondaires de l'invention, l'eau adsorbée par l'os traité peut diluer l'acétone, et faire ainsi diminuer sa concentration, l'os 5 n'ayant pas été séché avant de subir cette étape d'extraction à l'acétone. La concentration *in situ* reste toutefois toujours supérieure à 80 %, et même le plus souvent à 90 %, du moins dans les conditions préférées de l'invention.

10 Ce traitement est éventuellement renouvelé, après une étape intermédiaire de lavage entraînant les résidus extraits du matériel osseux, de manière à assurer le temps de contact utile dans des conditions optimales.

15 Selon un mode de mise en oeuvre préféré, lorsque le traitement est renouvelé, le second bain est plus long que le premier et effectué préférentiellement à température ambiante ordinaire.

En outre, l'acétone s'est montrée même préférable à l'urée comme solvant d'extraction dans le traitement d'un 20 matériel de départ constitué d'os humain. La qualité des résultats obtenus semble due, au moins pour une bonne part, à une meilleure pénétration du solvant au sein de l'échantillon osseux traité, encore améliorée quand cet échantillon est préalablement lavé à l'eau sous pression 25 dans l'étape dite de sensibilisation. De ce fait, on peut avantageusement opérer sur des échantillons relativement gros qu'il n'est pas besoin de fragmenter.

En particulier, il est apparu avantageux d'opérer sur des blocs d'épaisseur comprise entre 0,5 et 5 cm, de 30 l'ordre de 10 à 20 ou 10 à 30 millimètres, comme on peut en obtenir en découpant la source usuelle d'os humain que représentent les têtes de fémur en deux ou trois morceaux. On évite de la sorte les pertes inévitables qu'entraînent les opérations de broyage avant traitement. On évite aussi

d'avoir à reconstituer des greffons aux dimensions de cet ordre que demandent certaines applications.

D'autre part, l'étude des résultats obtenus par le procédé de l'invention, dans ses modes de mise en oeuvre préférés, a fait apparaître un effet synergique des traitements combinés à l'acétone et à l'urée. Il semble que l'acétone soit particulièrement efficace à extraire les virus dits enveloppés, et que l'urée soit au contraire plus efficace sur les virus non enveloppés. Quoi qu'il en soit, diverses analyses, effectuées à divers stades du procédé suivant l'invention, ont démontré que par la combinaison de ces deux solvants d'extraction, dans des étapes éventuellement renouvelées plus d'une fois et intercalées avec des étapes de lavage et rinçage, permet avec une très grande sécurité de débarrasser le tissu osseux de tous agents contaminants, notamment d'une part des virus dont on peut craindre la présence en forme transmissible tout particulièrement dans des tissus d'êtres humains, tels que ceux des hépatites, de la poliomyélite, ou du sida (HIV), et d'autre part des agents non conventionnels, tels que les prions de la maladie de Creutzfeld-Jacob et des maladies encéphalopathiques spongiformes apparentées.

Conformément à une caractéristique secondaire de l'invention, il est avantageux de réaliser le traitement à l'acétone avant celui à l'urée, ce que l'on peut mettre en relation avec une meilleure capacité de l'acétone à pénétrer au sein du matériel osseux, dans les espaces intertrabéculaires. On peut d'ailleurs admettre que cette capacité figure parmi les facteurs qui rendent l'intérêt de l'étape d'extraction à l'acétone particulièrement sensible dans le cas du traitement d'os humain, car elle contribue avec le fait que d'une manière générale, l'écartement intertrabéculaire moyen y est plus large que dans l'os bovin, pour rendre le procédé efficace sur des fragments d'os relativement gros, qui n'ont plus besoin d'être fragmentés avant d'être mis en contact avec les solvants d'extraction.

Mais bien entendu, l'invention ne se limite pas pour autant à ce cas d'application industrielle, et dans tous les cas, l'extraction à l'acétone a pour effet complémentaire de faciliter l'accès au sein du tissu osseux pour les étapes ultérieures d'extraction.

Pour les mêmes raisons, il est apparu bénéfique de soumettre les échantillons osseux en cours de traitement, à un stade intermédiaire entre l'extraction à l'acétone et l'extraction à l'urée, à une étape de sensibilisation analogue à celle qui est préconisée en lavage avant l'action de l'acétone. Il s'agit donc notamment d'exposer le tissu osseux à un jet d'eau sous pression, avec pour effet de détacher les tissus mous encore présents par une action physique de mise en suspension. En utilisant de l'eau purifiée bactériologiquement additionnée d'une composition détergente, on peut exercer en plus une action préliminaire d'ordre chimique avant leur mise en solution par l'agent d'extraction. Des compositions détergentes non moussantes à base de phosphates et polyphosphates alcalins, éventuellement chlorés, se sont révélées particulièrement efficaces en cela et par une action désinfectante complémentaire. Notons que l'acétone, utilisée dans ce cas comme détergent, peut également se révéler efficace fortement diluée. La concentration des compositions détergentes à base de phosphates et de polyphosphates est préférentiellement comprise entre 1 et 10 % en poids, et notamment de l'ordre de 2 à 5 % en poids.

L'invention présente encore d'autres caractéristiques secondaires qui ont plutôt trait aux conditions de mise en oeuvre dans des installations industrielles. En particulier, il est avantageux d'équiper des banques d'os collectant des prélèvements d'os humains à l'état congelé, à proximité du lieu de prélèvement pour permettre une bonne traçabilité en fonction des donneurs, d'installations automatisées de faible capacité dans lesquelles les différentes étapes de procédé sont effectuées en série dans

des ateliers aseptisés fonctionnant en continu sur des lots d'un nombre restreint de têtes de fémur (1 à 5 notamment, un nombre de une à quatre têtes étant encore préférable).

Dans des formes de mise en oeuvre particulièrement élaborées du procédé, appliquée au départ d'os humain et observant les conditions spécifiques à l'invention dans ses étapes nouvelles par rapport à l'art antérieur en la matière, combinées à des étapes en elles-mêmes classiques, au moins les étapes initiales de nettoyage mécanique et lavage à l'eau sous pression, avant et/ou après découpage ou broyage éventuel, portent sur des prélèvements de tissu osseux provenant entièrement d'un donneur unique, jugé sain, afin de réduire les risques de contamination croisée. En opérant avantageusement à température tiède, ici de l'ordre de 30 °C, on peut obtenir une importante élimination des lipides, constituants essentiels de la moelle osseuse, ramenant leur teneur à environ 2 % seulement.

Ensuite, les étapes que l'on peut dire virucides à proprement parler (aptes à inactiver les virus spécialement) peuvent prendre en charge des lots un peu plus importants, doubles par exemple. Elles comprennent successivement l'extraction à l'acétone, l'étape intermédiaire d'attaque par une solution détergente aqueuse sous pression, l'extraction à l'urée, et un traitement thermique subséquent (dans des conditions connues pour agir sur le virus du sida notamment) avant une stérilisation finale.

En pratique, on est souvent amené à conduire l'extraction à l'urée en faisant passer les fragments osseux dans deux bains successifs de solution aqueuse d'urée.

Suivant des caractéristiques secondaires de l'invention, les bains successifs de solution aqueuse d'urée ont des concentrations comprises entre 2 et 10 M, et de préférence de l'ordre de 5 à 8 M.

Bien qu'étant à températures tièdes, ici de l'ordre de 30 à 35°C, l'étape d'extraction à l'urée est plus longue que l'étape d'extraction à l'acétone effectuée à température ambiante ordinaire, ceci en fonction d'une durée de contact 5 souhaitable plus longue en général que pour l'extraction à l'acétone.

Pour compléter la description des caractéristiques de l'invention ainsi que celle de ses avantages et résultats, on considérera maintenant quelques exemples de 10 mise en oeuvre, qui bien entendu ne sont pas limitatifs.

EXAMPLE 1

Il s'agit de traiter des têtes de fémur humaines afin d'en éliminer les éventuels agents contaminants, qu'ils soient notamment bactériens, fongiques ou viraux, et 15 d'obtenir ainsi des greffons osseux qui seront utilisés en chirurgie comme implant.

Conformément à l'invention, le traitement comporte principalement deux étapes caractéristiques, qui ont essentiellement un rôle d'élimination des virus indécelables 20 éventuellement présents par extraction des lipides et autres résidus (sanguins notamment) pouvant subsister dans les espaces inter-trabéculaires. La première utilise comme réactif l'acétone et l'autre l'urée.

Au préalable, chaque tête est débarrassée de sa 25 partie corticale puis découpée à l'aide d'une scie circulaire, en deux ou trois morceaux selon la taille de la tête de fémur. On cherche par là à obtenir des échantillons correspondant à des hémi-têtes présentant une épaisseur d'au plus 16 mm d'épaisseur (à 1 mm près), plus éventuellement 30 une tranche intermédiaire d'épaisseur au plus égale à 8 mm (également à 1 mm près).

Chaque tête est ensuite nettoyée à l'eau sous pression (jets sous 100 bars par exemple) jusqu'à ce que l'os prenne une couleur blanche à rosée très claire.

Les fragments osseux sont ensuite soumis à une 5 première étape d'extraction à l'acétone, dont l'action est la délipidation sélective et l'élimination des agents pathogènes, réalisée en disposant ces fragments, d'abord pendant 15 minutes dans un bêcher d'acétone à au moins 80 % (en pratique ici à 98 %), à température ambiante de 18 °C, 10 placé dans une cuve à ultrasons, puis ces fragments sont introduits dans un nouveau bain d'acétone, placé sous agitation magnétique pendant 3 heures, à une température voisine de 18° C.

Il est prévu un volume de 400 ml d'acétone pour 15 100 g d'os (poids initial).

Cette étape primaire de délipidation chimique sélective et d'élimination d'agents pathogènes permet de débarrasser les os d'un maximum de lipides, véhicules potentiels de virus et autres agents contaminants, et des 20 protéines non collagéniques. Elle est poursuivie jusqu'à ramener la teneur en lipides à moins de 2 %, alors qu'elle était initialement de 30 à 40 % en poids.

Les fragments osseux sont ensuite succinctement rincés à l'eau purifiée sous ultrasons pendant 30 minutes. 25 Puis ils sont soumis à une seconde délipidation dite classique, réalisée à l'aide d'un détergent non ionique anti-bactérien (à 4%) dans une cuve à ultrasons. Le détergent choisi est à base de phosphates et polyphosphates alcalins.

30 Cette seconde délipidation classique permet de parfaire l'élimination des lipides et d'éventuels débris médullaires ainsi que d'agir à nouveau sur les virus et/ou bactéries. Les résidus de détergent sont éliminés par rinçage à l'eau purifiée sous ultrasons.

Pour évaluer l'efficacité du traitement, des têtes de fémur ainsi traitées ont été analysées. Les analyses effectuées comprennent une étude histo-morphométrique et un test de coloration en plus du dosage des lipides. Elles ont 5 permis de constater :

- que la composition intrinsèque de l'os d'origine est très bien préservée dans sa structure collagénique de type I,
- que l'acétone parvient toujours au coeur du matériel osseux, bien que celui-ci se présente en blocs de dimensions 10 importantes (épaisseur comprise entre 8 et 16 mm) et bien qu'il s'agisse d'os humain plutôt que d'os bovin,
- et que le taux de purification virale est remarquable, notamment dans le cas de virus dits de type enveloppé que sont notamment :
 - 15 - le virus à ADN enveloppé de la maladie d'Aujesky (pseudo-rage, PRV), appartenant à la famille des herpès-viridae,
 - le virus à ARN enveloppé de la diarrhée bovine (BVDV), appartenant à la famille des togaviridae,
 - 20 - le virus HIV de type 1 responsable du sida, à ARN enveloppé, rétrovirus de l'immuno-déficience chez l'homme.

Pour mieux garantir la sécurisation microbienne et virale des greffons finalement, le procédé suivant l'invention se poursuit, après le rinçage à l'eau stérile, 25 par un traitement à l'urée 6 M, effectué sous ultrasons dans deux bains successifs. Après chacun, les résidus recueillis dans l'urée sont éliminés par un rinçage à l'eau purifiée, sous ultrasons.

Ce traitement complète les effets des opérations 30 précédentes en ce qui concerne l'extraction des protéoglycans et des glycoprotéines sans détruire les protéines collagéniques de type I, ainsi que l'action antivirale.

Du point de vue de l'action antivirale en complément de celle de l'acétone, l'urée parfait l'élimination des virus dit enveloppés ci-dessus. Elle a prouvé en outre une action propre particulièrement efficace contre les virus 5 dépourvus d'enveloppe que sont notamment :

- le parcovirus à ADN sans enveloppe de la souris dit MVM (pour "minute virus of mice" en anglais), connu pour être particulièrement résistant aux agents physico-chimiques usuels,

10 - le poliovirus ARN non enveloppé responsable de la poliomyélite, également connu pour sa forte résistance.

Les fragments osseux obtenus, ainsi délipidés et contenant uniquement des protéines collagéniques, sont placés dans de l'eau stérile, chauffée à 56-60 °C, sous 15 ultrasons. Ce traitement thermique a pour finalité principale de parfaire la destruction des bactéries et du virus HIV.

Le procédé comprend enfin un rinçage à l'éthanol puis l'évaporation de l'alcool, afin d'obtenir un greffon 20 final sec.

Celui-ci se conserve à 25° C, valeur typique pour parler de température ambiante ordinaire, jusqu'à son utilisation.

EXAMPLE 2

25 En complément aux essais analytiques déjà rapportés dans l'exemple 1, on a vérifié que l'innocuité du greffon final ne se limite pas aux virus conventionnels et que le traitement suivant l'invention est potentiellement efficace contre les prions, ceux notamment qui sont à l'origine de la 30 maladie de Creutzfeld-Jacob.

A cet égard, le traitement d'extraction à l'urée joue un rôle important, qui lui a déjà été reconnu à

l'occasion du procédé appliqué industriellement à l'os bovin suivant la technologie décrite dans le brevet européen déjà cité de la déposante.

Cet effet est cependant encore amélioré ici, dans la mesure où le réactif est mis en contact avec le tissu osseux après que celui-ci ait été soumis à l'étape d'extraction à l'acétone. Il est à noter que les étapes de sensibilisation par action d'eau sous pression et/ou d'une solution aqueuse détergente améliorent encore les résultats.

10

EXAMPLE 3

15

Le procédé est ici appliqué au traitement d'os humain, sous une forme automatisée. Pour l'essentiel, les étapes sont conduites dans des cabines ou salles blanches, avec transfert des produits par robot d'une cuve de traitement à l'autre. Les opérations demandant une intervention manuelle sont effectuées dans des boîtes à gants. C'est le cas notamment pour les étapes de sensibilisation effectuées par projection d'eau sous pression.

20

S'agissant de têtes fémorales entières, prélevées chez des patients opérés ou décédés pour coxarthrose, chaque tête est soumise séparément aux premières étapes de nettoyage, découpage, sensibilisation, jusqu'à l'étape d'extraction par l'acétone. Les risques de contamination croisée sont ainsi très réduits. La petite taille des lots soumis aux étapes robotisées (1 à 4 têtes au maximum traitées simultanément dans un lot) contribue à minimiser encore ce risque.

30

L'os découpé se présente sous la forme finale de livraison aux utilisateurs. Les fragments comportent deux hém-têtes de 16 mm d'épaisseur au maximum (partie latérale et hémisphérique d'une tête fémorale) et éventuellement une tranche centrale de 8 mm d'épaisseur au maximum.

Avant d'introduire les os dans la ligne de traitement, on aura commencé par s'assurer que le donneur présente le maximum de sécurité (questionnaire médical et analyse sérologique). Seuls les prélevements cryo-conservés qui présentent un niveau de sécurité suffisant pour une utilisation thérapeutique sont acceptés pour subir le traitement complémentaire du procédé suivant l'invention.

Les examens sérologiques effectués sont choisis pour prouver notamment l'absence de réaction aux essais à 10 l'anticorps anti-HIV (type 1), à l'antigène d'hépatite HBs, à l'anticorps anti-HBc, à l'anticorps anti-HCV (virus de l'hépatite C). En attente de traitement, les os retenus, encore conditionnés en boîtes stériles, sont stockés dans des congélateurs à -35°C.

15 Le traitement des échantillons commence par une étape de décortication qui a pour objectif la mise à nu de l'os spongieux, permettant ensuite aux réactifs de mieux pénétrer au cœur du greffon. La tête est placée dans une cabine isolée avec manipulation à distance à travers les 20 parois (boîte à gants) dédiée à cette étape, puis elle est fixée dans un étau afin de la maintenir immobile. A l'aide d'une fraise pneumatique, l'os cortical est progressivement abrasé.

Puis, la tête est nettoyée par projection d'eau sous 25 pression (eau osmosée sous pression filtrée bactériologiquement) additionnée d'une composition organique de détergent non ionique à action désinfectante. Un contrôle visuel permet de vérifier la qualité du nettoyage mécanique. Cette étape permet de débarrasser la trame osseuse de la 30 majorité des éléments immunogènes, en particulier des lipides et du sang, ainsi que de la moelle.

Vient ensuite l'étape primaire de délipidation sélective et d'élimination d'agents pathogènes à l'acétone. Comme les précédentes, chaque tête y est soumise séparément,

afin d'éviter toute contamination croisée entre des prélevements provenant de donneurs différents.

Cette étape a pour objectif de débarrasser l'os des lipides résiduels, véhicules potentiels de virus et autres agents contaminants, contenus dans la trame osseuse. A l'issue de cette étape, l'os est débarrassé de la quasi-totalité des débris cellulaires et délipidé jusqu'à moins de 2 % en poids de lipides. Les paniers contenant l'os nettoyé sont disposés dans un bêcher contenant de l'acétone pure (concentration supérieure à 98 %). Puis, ils sont placés dans une cuve à ultrasons pendant 15 minutes. Le bain est renouvelé et cette étape continue sous agitation magnétique pendant 3 heures minimum.

La suite du traitement est entièrement robotisée.
15 Les unités fonctionnent en continu, pour traiter en série des lots de faible capacité, comportant chacun les fragments de quatre têtes au maximum. Les greffons sont reçus dans des paniers qui sont transférés par un convoyeur d'un bain de traitement à l'autre.

20 Tout d'abord, une délipidation classique à l'eau sous pression additionnée de détergent a pour objectif d'éliminer au niveau des trabécules osseuses des résidus lipidiques et des débris sanguins pouvant persister après l'élimination d'agents pathogènes, mais aussi d'exercer une 25 action antivirale et action antibactérienne propre.

Cette étape, entièrement automatisée, se déroule sous ultrasons pendant une durée de 1 h 20 minimum. A l'issue de cette étape, le greffon est délipidé. Il présente une trame minérale préservée et contient essentiellement des 30 protéines d'origine collagénique.

Suit alors un rinçage qui permet d'éliminer le détergent résiduel de l'étape précédente. Il est effectué au moyen d'eau osmosée filtrée bactériologiquement.

Le traitement à l'urée est alors effectué, dans des conditions propres à exercer une action antivirale et à éliminer principalement les agents transmissibles non conventionnels.

5 Cette étape est réalisée dans une cuve à ultrasons. Deux bains successifs à une température de 35 °C pendant une durée de deux fois deux heures sont utilisés. Ceci facilite un temps de contact environ double de celui nécessaire pour l'extraction à l'acétone. Un renouvellement des bains permet
10 d'améliorer l'efficacité du traitement en assurant l'apport de solution fraîche.

Après un nouveau rinçage pour débarrasser l'os des résidus d'urée, on procède à un traitement thermique qui a un double objectif : exercer une action antibactérienne et
15 une action antivirale (élimination complémentaire du virus HIV) plus une action visant à éliminer tous résidus de traitement. Il se déroule dans de l'eau purifiée au sein d'une cuve à ultrasons chauffante.

Ensuite, un dernier rinçage à l'éthanol a pour
20 objectif de faciliter le séchage final.

Après séchage en chaleur sèche, à une température suffisamment basse pour ne pas endommager la trame collagénique, un produit sec se conservant à la température ambiante ordinaire est obtenu.

25 Après contrôle visuel, chaque greffon est conditionné et placé dans une boîte conçue à cet effet pour être stocké ainsi en sortie de la chaîne de traitement automatique, en attente de leur envoi en stérilisation.

Cette stérilisation est réalisée par rayonnement
30 ionisant produit par un faisceau d'électrons accélérés qui permet une destruction des éventuels micro-organismes résiduels. Elle offre au chirurgien la garantie d'un produit stérile.

EXAMPLE 4

Dans des conditions analogues à ce que l'on a décrit à l'occasion de l'exemple 1 ci-dessus, on a soumis au traitement de l'invention, d'une part des échantillons d'os humain, d'autre part des échantillons d'os bovin. Les uns comme les autres étaient concassés en fragments de granulométrie moyenne de l'ordre du centimètre.

L'histo-morphométrie des greffons après traitement conduit aux résultats suivants :

| 10 | Valeurs moyennes pour os | Humain | Bovin |
|----|---|--------|-------|
| | Volume du tissu osseux (%) | 27 | 34 |
| | Epaisseur moyenne des trabécules (μm) | 178 | 165 |
| | Nombre moyen des trabécules (/mm) | 1,4 | 2,0 |
| | Ecartement moyen inter-trabéculaire (μm) | 555 | 343 |

15 Les résultats d'une analyse de la composition chimique des différents greffons se traduisent par les moyennes suivantes :

| | Pourcentage en poids | Os humain | Os bovin |
|----|--------------------------|-----------|----------|
| | Eau | 6,7 % | 7,4 % |
| 20 | Calcium Ca ⁺⁺ | 23,7 % | 22,2 % |
| | Phosphore | 10,7 % | 11,9 % |
| | Lipides | 0,1 % | 0,1 % |
| | Protéines | 29,9 % | 29,6 % |
| | Collagène | 26,9 % | 26,4 % |

25 Dans tous les cas les chiffres respectent une proportion de collagène comprise entre 20 et 40 % en poids (plus précisément de 25 à 35 % en poids) et une proportion de calcium comprise entre 15 et 25 %, qui témoignent ensemble de la conservation de la structure osseuse
30 essentiellement composée de collagène et d'hydroxy-apatite, et le taux de lipides restant est quasiment inexistant, en tout cas nettement inférieur à 2 %.

EXAMPLE 5

Les produits issus du traitement suivant l'exemple 1 ont fait l'objet d'études de biocompatibilité pour s'assurer que le tissu conserve sa fonctionnalité en prothèse osseuse 5 et qu'il ne soit pas devenu toxique du fait du traitement.

Les essais normalisés ci-après ont tous donné des résultats favorables :

- Evaluation du pouvoir sensibilisant induit chez le cobaye (selon ISO/EN 30993-10),
- 10 - Test de cytotoxicité (selon ISO/EN 30993-5),
- Test de toxicité systémique aiguë (selon ISO/EN30993-11),
- Test de génotoxicité (selon ISO/EN30993-3) qui comporte :
 - Test d'Ames (selon OCDE 471),
 - Test d'aberrations chromosomiques sur lymphocytes 15 humains (selon OCDE 473).

On peut conclure sans ambiguïté à une excellente biocompatibilité.

Des essais d'implantation à long terme en site trabéculaire des greffons obtenus par traitement d'os humain 20 ont également été réalisés avec succès.

Parmi eux, on citera en exemple l'implantation à long terme chez le mouton (selon EN 30993-6), suivant laquelle on a pu observer une excellente néo-apposition osseuse à trois mois.

25

EXAMPLE 6

Les conditions opératoires appliquées dans l'exemple 1 ont été reprises sur des prélèvements osseux d'origine humaine ou d'origine bovine, en ajoutant, suivant les cas, une étape de concassage en fragments de dimensions de 30 l'ordre de 1 à 3 cm, ou une étape de broyage à une

granulométrie inférieure à 0,5 cm, en étape précédant les traitements essentiels à l'acétone et à l'urée.

L'intérêt d'un broyage n'est guère sensible que dans le cas du traitement d'os humain, plus particulièrement de 5 prélèvements osseux limités à des têtes de fémur, ou lorsque le matériau obtenu est destiné à des applications qui demandent qu'il soit sous forme de poudre.

EXEMPLE 7

Des essais ont été réalisés pour vérifier l'action 10 virucide exercée par l'acétone et par l'urée.

Les résultats sont résumés ci-après, pour les virus qui ont déjà été pris en considération à l'exemple 1 ci-dessus. Ils sont exprimés par les facteurs de réduction en log (puissances de 10), avec, en moyenne :

15 Facteur de réduction
pour le solvant d'extraction :

| | | Acétone | Urée 1 | Urée 2 |
|----|---------------|---------|--------|--------|
| | Virus : HIV-1 | > 4,32 | > 4,19 | > 4,19 |
| | PRV | > 4,59 | > 4,61 | > 4,61 |
| 20 | BVDV | > 4,95 | > 4,08 | > 4,08 |
| | Polio | > 4,68 | > 5,19 | > 5,19 |
| | MVM | > 1,22 | > 3,55 | > 3,55 |

Il s'ensuit les facteurs de réduction cumulatifs suivants :

| | | |
|----|-------|-------|
| 25 | HIV-1 | 12,70 |
| | PRV | 13,81 |
| | BVBV | 13,11 |
| | Polio | 15,06 |
| | MVM | 8,32 |

30 L'action virucide propre à l'acétone est donc pleinement vérifiée. Elle se combine avec une préparation du

matériel osseux par élimination d'agents pathogènes à cœur (reliquat de lipides inférieur, 0,2 % en poids) qui le rend plus réceptif à l'action virucide subséquente de l'urée.

La description qui précède explique clairement, 5 notamment à l'aide des exemples détaillés qui viennent d'être exposés, comment l'invention procède d'une manière que ne pouvait prédire l'homme de l'art et comment elle permet d'atteindre les objectifs qu'elle s'est fixés. En particulier, elle permet de réaliser des greffons osseux qui 10 sont utilisables sans risque de contamination en chirurgie humaine tout en assurant une bonne qualité d'ostéosynthèse.

Bien que l'on puisse partir de tout matériel osseux animal (le cas d'exemple typique étant celui des os restant des carcasses de bovins destinées à la boucherie), il est 15 préféré d'utiliser comme tissu osseux de départ des fragments d'os humains, prélevés sur des cadavres (il peut s'en trouver sous forme d'os cortical, d'os spongieux, ou d'os déminéralisé) ou sur des donneurs vivants (en général de l'os spongieux, l'os cortical n'étant disponible qu'en 20 faibles quantités). Les formes de mise en oeuvre préférées de l'invention sont particulièrement adaptées au traitement de têtes de fémur découpées de manière appropriée.

Le traitement d'extraction par l'acétone, 25 avantageusement combiné à un traitement de sensibilisation par de l'eau sous pression, et avantageusement suivi par au moins une étape d'extraction par une solution d'urée (préférentiellement deux étapes de ce genre), permet d'atteindre un haut degré de délipidation et de purification. Dans les conditions de mise en oeuvre 30 préconisées, ledit traitement d'extraction à l'acétone a tendance à éliminer particulièrement les virus enveloppés tandis que ledit traitement d'extraction à l'urée a tendance à éliminer particulièrement les virus nus, non enveloppés.

Le procédé permet néanmoins de préserver la structure d'origine du tissu osseux à base de collagène de type I, ce qui est nécessaire à une bonne intégration par ostéosynthèse sur un greffon osseux implanté qui est 5 constitué du matériau suivant l'invention.

Au cas où cela ne ressortirait pas suffisamment de toutes les explications qui précèdent, on peut souligner :

- que si le procédé suivant l'invention se prête sans difficulté au traitement d'échantillons osseux cryo-10 conservés après prélèvement, il peut aussi être appliqué sur place directement après prélèvement, ce qui conduit à une réduction des coûts et facilite la traçabilité des greffons du donneur au receveur ;
- que l'on peut également éviter la congélation du 15 produit finalement obtenu, lequel peut être conservé à l'état sec ou préalablement lyophilisé, à la température ambiante ordinaire de 18 à 25 °C ;
- que les essais effectués ont confirmé l'efficacité du traitement d'extraction à l'urée sur les prions, qui est 20 encore améliorée dans le procédé tel que mis en oeuvre suivant l'invention ;
- que le procédé est au total exclusivement à base de solvants non agressifs pour l'os et qu'il permet néanmoins d'éliminer totalement les lipides et les autres constituants 25 sanguins porteurs potentiels de virus, et même les agents dits non conventionnels des maladies à prions, étant entendu que l'élimination des agents infectieux bactériens et fongiques moins résistants est également assurée ;
- que la possibilité de traiter des hém-têtes de fémurs 30 humains dans cette conformation constitue un atout important, car d'une manière équivalente au cas d'un traitement d'un produit broyé à l'état pulvérulent, on parvient à faire se succéder en alternance, sur des fragments relativement gros, une action physique de mise en

suspension des constituants potentiellement nocifs avec une action chimique de solubilisation de ces constituants ;

- que le procédé suivant l'invention n'utilise pour autant que des solvants dont la mise en oeuvre, tout au moins dans les conditions préconisées préférentiellement et pour les étapes délicates d'extraction, n'entraîne pas de risques tels que les risques d'explosion des alcools légers, ce qui évite des surcoûts pour les installations industrielles.

10 Au total, les greffons obtenus suivant l'invention conviennent aux mêmes applications que l'os cryo-conservé traditionnel. Leurs indications concernent notamment la reconstruction ou le comblement de défauts osseux, lors des reprises de prothèse totale de hanche ou de genou, lors 15 d'arthrodèses vertébrales, lors de chirurgies d'exérèse tumorale, lors de la traumatologie ou de toute indication de greffe osseuse de l'appareil locomoteur ou du rachis, ou encore en chirurgie dentaire. La différence avec les greffons cryo-conservés réside dans la sécurité qu'apporte 20 le procédé de traitement auquel les prélèvements sont soumis conformément à l'invention vis-à-vis des risques de contamination infectieuse microbiologique, et ce sans perturber pour autant leur capacité à favoriser l'ostéosynthèse, le traitement ne dénaturant pas la 25 structure osseuse essentielle à cet effet, faite de collagène, principalement de type I, et d'hydroxyapatite.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un matériau d'ostéoplastie par traitement d'un tissu osseux d'origine naturelle, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à soumettre le tissu osseux naturel de départ, à des opérations successives d'extraction des lipides et autres constituants potentiellement porteurs d'agents pathogènes, comportant au moins une étape d'extraction au moyen d'un solvant constitué par une cétone telle que l'acétone, effectuée à température n'excédant pas 40 °C, de telle sorte que la structure osseuse d'origine à base de collagène de type I est préservée.
2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape d'extraction à l'acétone est suivie d'une étape d'extraction à l'urée effectuée à une température n'excédant pas 40 °C.
3. Procédé suivant les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ledit traitement d'extraction à l'acétone est conduit de manière à éliminer particulièrement les virus enveloppés et en ce que ledit traitement d'extraction à l'urée est conduit de manière à éliminer particulièrement les virus non enveloppés.
4. Procédé suivant l'une des revendications 2 à 3, caractérisé en ce que ladite étape d'extraction à l'acétone est effectuée à température ambiante ordinaire, et que ladite étape d'extraction à l'urée est effectuée à sous chauffage léger, notamment à une température de l'ordre de 30 à 35 °C.
5. Procédé suivant la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que l'urée est utilisée à une

concentration comprise entre 2 et 10 M, préférentiellement entre 5 et 8 M.

6. Procédé suivant l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que ladite étape d'extraction à l'urée est précédée d'une étape de sensibilisation à l'eau sous pression.

7. Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite étape d'extraction à l'acétone est précédée d'une étape de sensibilisation à l'eau sous pression facilitant la pénétration du solvant d'extraction au sein du tissu osseux.

8. Procédé suivant la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que ladite étape de sensibilisation est effectuée au moyen d'eau sous pression additionnée d'un détergent non ionique anti-bactérien, notamment à base de phosphates et polyphosphates alcalins.

9. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'acétone est utilisée pure, sensiblement non diluée, ce qui conduit in situ à une concentration supérieure à 80%.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 5, éventuellement complété par l'une quelconque des caractéristiques des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que l'étape d'extraction à l'urée est renouvelée au moins une fois pour assurer un temps de contact sensiblement double par rapport à l'étape d'extraction à l'acétone, et éventuellement à chacune des étapes dites de sensibilisation suivant la revendication 7 ou la revendication 8.

11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite

étape d'extraction à l'acétone est renouvelée, la seconde extraction à l'acétone étant préférentiellement plus longue que la première.

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est appliqué à des prélèvements d'os humain découpés sous forme de tranches ou de fragments d'épaisseur comprise entre 0,5 et 3 cm, et à ce qu'il est de préférence mis en oeuvre de manière automatique sur des lots de faible capacité traités en série, chacun constitué notamment de une à quatre têtes fémorales humaines préalablement soumises individuellement à un nettoyage mécanique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | GB 949 277 A (OTTO BRAUN) 12 February 1964 (1964-02-12) the whole document | 1,2 |
| A | WO 95 19797 A (CRYOLIFE INC) 27 July 1995 (1995-07-27) claims; examples 1-10 | 1-12 |
| A | WO 91 07194 A (TRANSPHYTO SA) 30 May 1991 (1991-05-30) cited in the application claims; examples | 1-12 |
| A | FR 2 134 695 A (MINI EN ELECTRIC) 8 December 1972 (1972-12-08) claims | 1-12 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2000

Date of mailing of the international search report

04/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ESPINOSA, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande : Internationale No

PCT/FR 00/02464

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|--|
| GB 949277 | A | AUCUN | |
| WO 9519797 | A 27-07-1995 | US 5513662 A AU 689227 B AU 1833295 A BR 9506498 A CA 2180447 A CN 1143913 A EP 0740555 A JP 9508040 T NO 962874 A | 07-05-1996 26-03-1998 08-08-1995 27-04-1999 27-07-1995 26-02-1997 06-11-1996 19-08-1997 03-09-1996 |
| WO 9107194 | A 30-05-1991 | FR 2654625 A AT 133076 T AU 6885891 A BR 9007861 A CA 2069450 A CN 1052430 A DE 69024970 D DK 502055 T EP 0502055 A ES 2084713 T GR 3019166 T JP 5501975 T KR 169328 B OA 9699 A PT 95955 A,B RU 2104703 C TR 25032 A US 5585116 A | 24-05-1991 15-02-1996 13-06-1991 29-09-1992 23-05-1991 26-06-1991 29-02-1996 20-05-1996 09-09-1992 16-05-1996 31-05-1996 15-04-1993 15-01-1999 30-08-1993 13-09-1991 20-02-1998 01-09-1992 17-12-1996 |
| FR 2134695 | A 08-12-1972 | AUCUN | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Search Application No

PCT/FR 00/02464

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|---|------------------|-------------------------|--|------------------|
| GB 949277 | A | | NONE | | |
| WO 9519797 | A | 27-07-1995 | US 5513662 A | | 07-05-1996 |
| | | | AU 689227 B | | 26-03-1998 |
| | | | AU 1833295 A | | 08-08-1995 |
| | | | BR 9506498 A | | 27-04-1999 |
| | | | CA 2180447 A | | 27-07-1995 |
| | | | CN 1143913 A | | 26-02-1997 |
| | | | EP 0740555 A | | 06-11-1996 |
| | | | JP 9508040 T | | 19-08-1997 |
| | | | NO 962874 A | | 03-09-1996 |
| WO 9107194 | A | 30-05-1991 | FR 2654625 A | | 24-05-1991 |
| | | | AT 133076 T | | 15-02-1996 |
| | | | AU 6885891 A | | 13-06-1991 |
| | | | BR 9007861 A | | 29-09-1992 |
| | | | CA 2069450 A | | 23-05-1991 |
| | | | CN 1052430 A | | 26-06-1991 |
| | | | DE 69024970 D | | 29-02-1996 |
| | | | DK 502055 T | | 20-05-1996 |
| | | | EP 0502055 A | | 09-09-1992 |
| | | | ES 2084713 T | | 16-05-1996 |
| | | | GR 3019166 T | | 31-05-1996 |
| | | | JP 5501975 T | | 15-04-1993 |
| | | | KR 169328 B | | 15-01-1999 |
| | | | OA 9699 A | | 30-08-1993 |
| | | | PT 95955 A, B | | 13-09-1991 |
| | | | RU 2104703 C | | 20-02-1998 |
| | | | TR 25032 A | | 01-09-1992 |
| | | | US 5585116 A | | 17-12-1996 |
| FR 2134695 | A | 08-12-1972 | NONE | | |

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61L27/36

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | GB 949 277 A (OTTO BRAUN) 12 février 1964 (1964-02-12) le document en entier --- | 1,2 |
| A | WO 95 19797 A (CRYOLIFE INC) 27 juillet 1995 (1995-07-27) revendications; exemples 1-10 --- | 1-12 |
| A | WO 91 07194 A (TRANSPHYTO SA) 30 mai 1991 (1991-05-30) cité dans la demande revendications; exemples --- | 1-12 |
| A | FR 2 134 695 A (MINI EN ELECTRIC) 8 décembre 1972 (1972-12-08) revendications ----- | 1-12 |

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiqué)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ESPINOSA, M

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)